

Kandungan Flavonoid dan Limonoid pada Berbagai Fase Pertumbuhan Tanaman Jeruk Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) dan Purut (*Citrus hystrix* Dc.)

Devy, N.F., F. Yulianti, dan Andrini

Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jl. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu 65301
Naskah diterima tanggal 13 Agustus 2010 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 8 November 2010

ABSTRAK. Tanaman jeruk mengandung metabolit sekunder flavonoid, karotenoid, dan limonoid yang banyak terdapat dalam daun, kulit buah, biji, dan *pulp*. Penelitian bertujuan mengetahui kandungan flavonoid dan limonoid pada berbagai fase pertumbuhan tanaman jeruk Kalamondin dan Purut serta mendapatkan informasi kandungan limonoid pada fase embrio dan planlet hasil perbanyakan in vitro melalui embriogenesis somatik. Penelitian dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) sejak bulan Mei sampai dengan Desember 2009. Ruang lingkup penelitian terdiri atas (1) identifikasi metabolit sekunder yaitu flavonoid dan limonoid pada berbagai fase pertumbuhan tanaman jeruk Kalamondin dan Purut dan (2) identifikasi limonoid pada fase embrio dan planlet tanaman jeruk Kalamondin yang diperbanyak dengan metode embriogenesis somatik secara in vitro. Analisis kandungan metabolit sekunder dilakukan di Unit Layanan Pengujian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan flavonoid dan limonoid dapat diproduksi dari berbagai bagian tanaman, seperti pada *pulp*, biji, kulit buah, dan daun pada berbagai fase pertumbuhan jeruk Purut dan Kalamondin. Kandungan flavonoid pada jeruk Purut dan Kalamondin tertinggi terdapat pada buah tua, masing-masing 18,8 ppm. Kandungan limonoid pada jeruk Purut hanya terdeteksi pada daun pendukung buah tua (1 ppm) dan biji (61 ppm), sedangkan pada jenis Kalamondin hanya terdeteksi pada biji yaitu sebesar 74 ppm.

Katakunci : *Citrus mitis*; *Citrus hystrix*; Flavonoid; Limonoid; Fitokimia; Kalamondin, Purut.

ABSTRACT. Devy, N.F., F. Yulianti, and Andrini. 2010. **Flavonoid and Limonoid Contents in Every Growth Phase of Kalamondin (*Citrus mitis* Blanco) and Purut (*Citrus hystrix* Dc.).** Citrus contains secondary metabolites such as flavonoid, carotenoid, and limonoid, which can be found in the leaf, peel of fruit, seeds, and pulp. The aims of this research were to determine flavonoid and limonoid contents in every growth phase of *Kalamondin* and *Purut* and the limonoid contents in embryo and planlet phases derived from in vitro somatic embryogenesis. The research was conducted in Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Research Institute (ICISFRI) from May to December 2009. The research consisted of two activities as follows: (1) analyses of flavonoid and limonoid contents in every growth phase of *Kalamondin* and *Purut* and (2) analyses of the limonoid contents in embryos and planlet proliferated from somatic embryogenesis culture. Flavonoid and limonoid contents were analyzed at the Assessment Service Unit, Faculty of Pharmacy, Airlangga University. The results showed that flavonoid and limonoid compounds could be produced in all parts of plant i.e., such as pulp, seeds, peel of fruit, and leaves from every growth phase of *Kalamondin* and *Purut*. In *Purut* and *Kalamondin*, the highest flavonoid content was obtained from ripen fruit, with concentration 18.8 ppm. Limonoid content in *Purut* was detected only in leaf supporting ripen fruit (1 ppm) and seeds (61 ppm), and in *Kalamondin* was only in seeds with concentration 74 ppm.

Keywords: *Citrus mitis*; *Citrus hystrix*; Flavonoid; Limonoid; Phytochemical; *Kalamondin*; *Purut*.

Jeruk merupakan tanaman buah yang dibudidayakan terbesar kedua di dunia setelah anggur (Spiegel-Roy dan Goldschmidt 1996). Peningkatan konsumsi buah berkorelasi positif dengan penurunan kasus penyakit jantung dan risiko penyakit kanker tertentu (Cano *et al.* 2008). Pada tanaman jeruk, bahan aktif yang penting bagi kesehatan antara lain ialah vitamin C, flavonoid, karotenoid, limonoid, dan mineral. Flavonoid merupakan bahan antioksidan yang mampu menetralkan oksigen reaktif dan berkontribusi terhadap pencegahan penyakit kronis seperti kanker (Fergusson 2002, Paulose 2005, Tripoli

et al. 2007). Flavonoid utama dalam jeruk ialah naringin, narirutin, dan hesperidin (Jacob *et al.* 2000) yang terdapat pada kulit buah, biji (Tripoli *et al.* 2007), dan *pulp* (Cano *et al.* 2008).

Limonoid merupakan komponen aktif alam penting yang terdiri atas komponen triterpenoid teroksidasi (Jacob *et al.* 2000, Khalil *et al.* 2003). Pada tanaman jeruk, limonoid diproduksi pada daun dan ditransfer ke buah dan biji dengan konsentrasi tertinggi pada biji selama masa pematangan buah. Dalam daun dan buah, kandungan total limonoid meningkat selama masa pertumbuhan. Kandungan limonoid

bervariasi bergantung pada kultivar, waktu panen, dan jaringan tanaman. Limonoid berfungsi menghambat perkembangan sel kanker. Senyawa ini relatif stabil pada suhu tinggi, sehingga banyak dicampurkan dalam kosmetik, permen, roti, dan biskuit (Fergusson 2002). Bahan-bahan ini merupakan produk metabolit sekunder tanaman, yang banyak digunakan dalam industri farmasi maupun kosmetika.

Pemanfaatan ekstrak jeruk pada industri farmasi maupun kosmetika membutuhkan ekstrak jeruk murni berikut informasi tentang kandungan komponennya. Teknik kromatografi diketahui efektif untuk memisahkan dan mengidentifikasi metabolit sekunder jeruk dengan resolusi dan presisi kuantitas yang cukup baik (Nogata *et al.* 2006). Aplikasi teknik kromatografi untuk identifikasi metabolit sekunder jeruk telah banyak dilakukan, seperti identifikasi flavonoid (Nogata *et al.* 2006, Cano *et al.* 2008), karotenoid (Kato *et al.* 2004, Xu *et al.* 2006), dan limonoid (Khalil *et al.* 2003, Paulose 2005).

Metabolit sekunder juga dapat diekstrak dari kultur sel yang banyak dilakukan di negara maju. Saat ini di Korea, produksi ginseng secara besar-besaran dilakukan kultur akar secara in vitro dalam suatu bioreaktor. Produksi metabolit sekunder dalam jeruk secara in vitro juga perlu dikaji lebih lanjut, seperti produksi metabolit sekunder pada tanaman yang lain.

Penelitian difokuskan pada analisis kandungan metabolit sekunder jeruk nonkomersial (jeruk Purut dan Kalamondin) pada berbagai fase pertumbuhan dan organ tanaman. Informasi kandungan metabolit sekunder bermanfaat dalam pengembangan koleksi plasma nutfah jeruk Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika nonkomersial. Tujuan penelitian ialah menentukan kandungan flavonoid dan limonoid pada berbagai fase pertumbuhan tanaman jeruk Kalamondin dan Purut serta mengetahui kandungan limonoid pada fase embrio dan planlet hasil perbanyakan in vitro melalui somatik embriogenesis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika. Analisis kandungan

metabolit sekunder dilaksanakan di Unit Layanan Pengujian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, mulai bulan Mei-Desember 2009. Kegiatan penelitian terdiri atas dua bagian, yaitu (1) analisis kandungan metabolit sekunder pada berbagai fase pertumbuhan tanaman jeruk Kalamondin dan Purut dan (2) analisis kandungan limonoid pada fase embrio dan planlet tanaman jeruk Kalamondin yang diperbanyak melalui kultur in vitro somatik embriogenesis.

Persiapan Bahan Tanaman dan Bahan Sampel di Lapangan

Bahan tanaman yang digunakan ialah tanaman jeruk Kalamondin dan Purut berumur ± 1 tahun yang ditanam di dalam pot berukuran diameter 30 cm dan tinggi 35 cm masing-masing berjumlah 10 pot. Media yang digunakan berupa campuran tanah : pukan = 1:1. Pemeliharaan tanaman dilakukan secara optimal dengan mengikuti prosedur standar. Analisis metabolit sekunder dilakukan pada beberapa fase pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Tabel 1). Analisis kandungan flavonoid dilakukan dengan metode spektrofotometri, sedangkan analisis kandungan limonoid dilakukan dengan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC).

Metode Analisis Kadar Flavonoid Total dengan Spektrofotometri

Preparasi sampel. Sampel sebanyak 50 mg dimasukkan ke dalam gelas labu volume 250

Tabel 1. Tahapan pertumbuhan tanaman yang dianalisis (*Plant growth phase be analyzed*)

Bagian tanaman (<i>Parts of plant</i>)	Kalamondin		Purut	
	I	II	I	II
Daun muda (<i>Young leaf</i>)	v	v	v	v
Daun tua (<i>Old leaf</i>)	v	v	v	v
Daun pendukung buah (<i>Leaf supporting flower</i>)	v	v	v	v
Kulit buah muda (<i>Peel of young fruit</i>)	v	v	v	v
Kulit buah tua (<i>Peel of ripen fruit</i>)	v	v	v*	v
Biji buah tua (<i>Seed of ripen fruit</i>)	v	v	v	v
Embrio dan planlet Kalamondin (<i>Embryo and plantlet of Kalamondin</i>)	x	v	x	x

v = dapat dianalisis (*can be analyzed*), x = tidak dapat dianalisis (*can not be analyzed*), v* = kulit + pulp (*peel + pulp*)



Gambar 1. Sampel daun tua, daun muda, dan buah jeruk Kalamondin (*Old leaf, flush, and fruits of Kalamondin sample*)



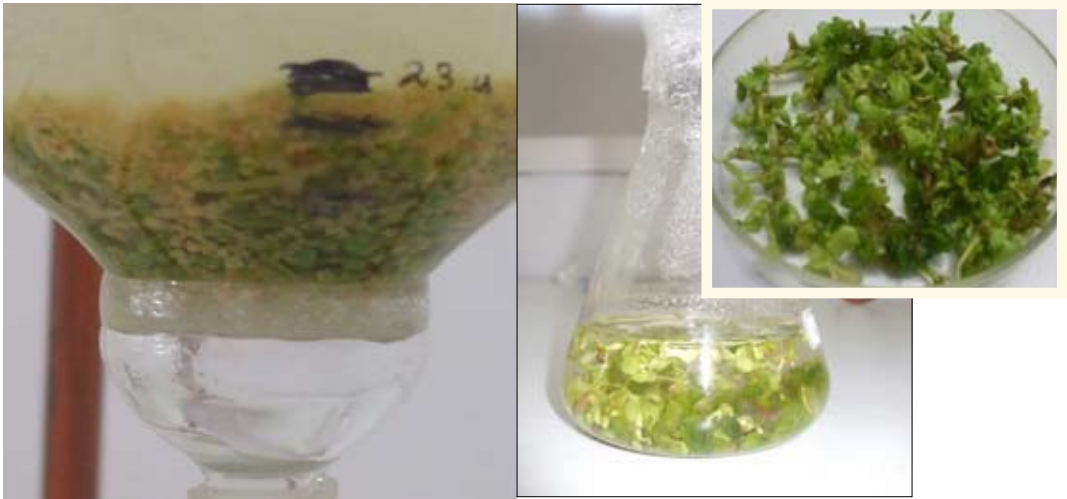
Gambar 2. Sampel daun tua, daun muda, dan buah jeruk Purut (*Old leaf, flush, and fruits of Purut sample*)

ml, selanjutnya ditambah dengan 10 ml HCl 1N dan 100 ml metanol dan *direfluks* selama 60 menit. Ekstrak yang dihasilkan disaring, ampas dibilas dua kali dengan 50 ml metanol, kemudian ampas dipekatkan. Ekstrak dilarutkan kembali dalam 50 ml air dan dipartisi dengan tiga kali 50 ml etil asetat. Fraksi etil asetat dipisahkan lalu dikeringkan. Fraksi etil asetat dilarutkan dengan 50 ml metanol di pipet sebanyak 2 ml dan ditambah 2 ml AlCl_3 2% dalam metanol, kemudian ditambah metanol hingga 5 ml.

Preparasi baku kuersetin. Kuersetin sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam gelas labu volume 25 ml, selanjutnya ditambah metanol

tepat 25 ml dan diultrasonik selama 15 menit. Dari larutan baku induk, dibuat larutan baku kerja, dengan pengenceran sbb.:

1. 0,025 ml larutan baku induk +2 ml AlCl_3 + metanol hingga 10,0 ml = 1,0 ppm,
2. 0,050 ml larutan baku induk +2 ml AlCl_3 + metanol hingga 10,0 ml = 2,0 ppm,
3. 0,100 ml larutan baku induk +2 ml AlCl_3 + metanol hingga 10,0 ml = 4,0 ppm,
4. 0,150 ml+2 ml AlCl_3 + metanol hingga 10,0 ml = 6,0 ppm,



Gambar 3. Sampel embrio dan planlet Kalamondin untuk analisis limonoid (*Sample of Kalamondin embryo and plantlet for limonoid analysis*)

5. 0,200 ml+2 ml AlCl_3 + metanol hingga 10,0 ml = 8,0 ppm.

Absorban larutan baku dan sampel diamati pada panjang gelombang 450. Kadar flavonoid total dihitung sebagai kuersetin dengan rumus:

$$C = 0,001 C \cdot D \cdot V / M \cdot 100\%$$

di mana:

C = kadar terukur,
D = pengenceran,
V = volume larutan,
M = berat sampel.

Analisis Limonoid dengan Metode HPLC

Sampel dilarutkan dalam metanol dan HCl, dihidrolisis selama 1 jam. Hasil diekstraksi dengan heksan. Cairan dicuci dengan heksan dan fase airnya diekstraksi dengan kloroform kemudian dilarutkan dalam acetonitril dan disuntikkan ke HPLC.

Produksi Embrio dan Planlet Jeruk Kalamondin sebagai Bahan Ekstraksi Limonoid Secara In Vitro

Eksplan yang digunakan ialah jaringan nuselus yang diambil dari buah muda berumur ± 14 minggu setelah bunga mekar. Eksplan nuselus dikulturkan pada media MS padat + 500 mg/l ME + 3 mg/l BAP. Kalus yang tumbuh diperbanyak dengan cara dishaker selama 8

minggu serta ditransfer ke dalam bioreaktor dengan media cair pada komposisi yang sama. Embrio yang tumbuh dari bioreaktor diperbanyak pada media embrio, yaitu : MS padat + Vit MS (2 kali). Pembesaran planlet pada media MS padat + 500 mg/l ME. Embrio dan planlet diekstrak untuk analisis limonoid. Analisis limonoid dilakukan dengan metode HPLC.

HASIL DAN PEMBAHASAN

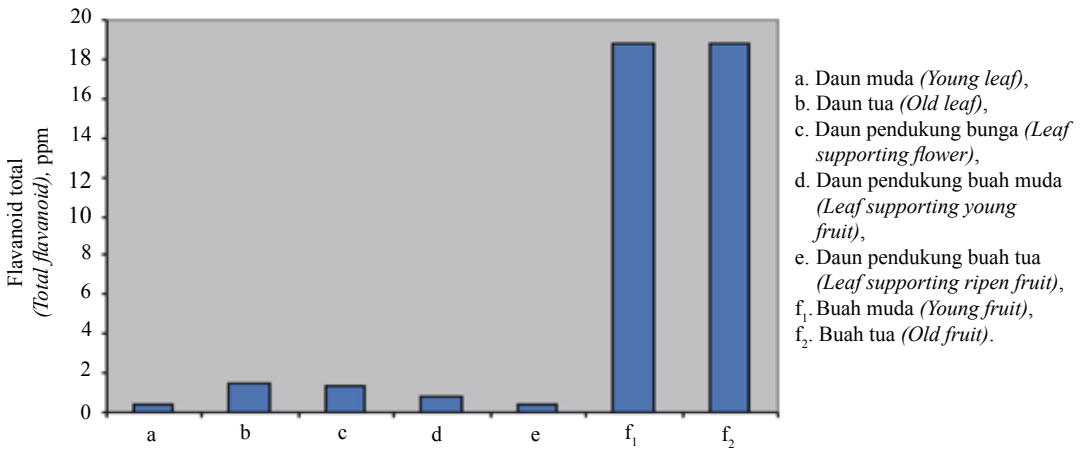
Kandungan Flavonoid Total

Kandungan Flavonoid Total pada Tanaman Jeruk Purut

Dari hasil analisis total flavonoid diketahui bahwa kandungan flavonoid memiliki pola yang teratur. Pada daun muda, kandungan flavonoid masih rendah, kemudian meningkat dengan makin tuanya daun, di mana fotosintesis terjadi secara optimal. Flavonoid ini diduga dialirkan dari daun ke bunga dan buah. Hal ini dapat dilihat dengan makin menurunnya kandungan flavonoid pada daun pendukung bunga dan pendukung buah. Flavonoid total meningkat drastis pada buah muda maupun buah tua (Gambar 4).

Kandungan Flavonoid Total pada Tanaman Jeruk Kalamondin

Jeruk Kalamondin merupakan jeruk hias yang mempunyai pola pertumbuhan berbeda dengan



Gambar 4. Pola kandungan flavonoid total pada tanaman jeruk Purut (*Pattern of total flavonoid content in Purut*)



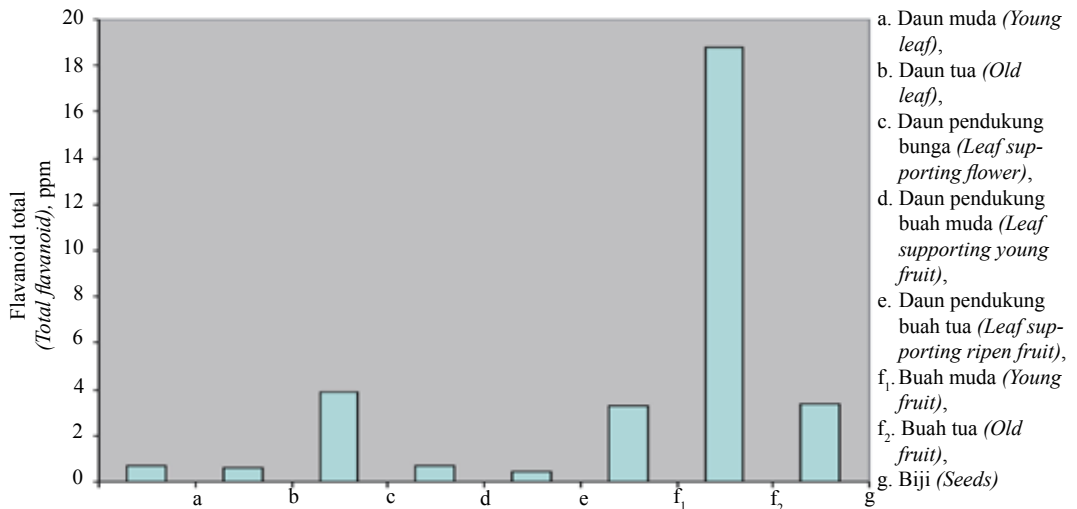
Gambar 5. (a) Tanaman Kalamondin (terdapat daun muda, tua, bunga, buah muda, dan buah tua) (a) *Kalamondin plant (have flush, old leaf, flower, young and ripe fruits)*, (b) jeruk Purut (hanya terdapat daun tua dan buah tua) (b) *Purut plant (only have old leaf and ripe fruit)*

jeruk Purut. Jenis ini berbunga sepanjang tahun yang berbeda dengan jenis lainnya, sehingga dalam satu tanaman terdapat berbagai fase pertumbuhan (Gambar 5a). Dari hasil analisis diketahui bahwa kandungan flavonoid tidak berpola seperti jeruk Purut (Gambar 6).

Pada jeruk Kalamondin, kadar flavonoid relatif tinggi ditemukan pada daun muda, kemudian konsentrasinya mulai menurun pada daun tua. Hal ini diduga karena adanya translokasi flavonoid dari daun muda ke daun tua, kemudian terakumulasi pada daun-daun pendukung bunga yang kemudian didistribusikan ke dalam bunga.

Dengan adanya aliran ini, maka kadar flavonoid dalam daun yang menjadi pendukung buah muda dan tua menurun karena bahan tersebut ditranslokasikan ke buah serta biji. Peningkatan konsentrasi flavonoid pada buah dan daun muda terjadi karena adanya peningkatan aktivitas enzim *chalcone syntase*, salah satu prekursor pembentuk flavonoid (Lewinsonh *et al.*1989).

Menurut Pichaiyongvongdee dan Haruenkit (2009), kadar naringin pada jeruk pameloid ditemukan dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan limonin pada semua bagian tanaman. Urutan kadar naringin yang tertinggi berturut-



Gambar 6. Pola kandungan flavonoid total pada tanaman jeruk Kalamondin (Pattern of total flavonoid content in Kalamondin)

turut ditemukan pada bagian albedo, flavedo, segmen membran, biji, dan jus. Kandungan naringin tertinggi terdapat pada albedo berkisar antara 28.508,01-10.065,06 ppm dan terendah pada jus berkisar 386,45-242,63 ppm, sedangkan pada biji berkisar antara 426,66-257,87 ppm.

Kandungan Limonoid

Kandungan Limonoid pada Tanaman Jeruk Purut dan Kalamondin

Limonoid pada tanaman jeruk menyebabkan rasa getir/pahit pada jus buahnya, sehingga harus dihindari oleh industri pengalengan jeruk. Namun, limonoid aglycone yang mempunyai rasa getir berubah menjadi glukosida seiring dengan bertambahnya kematangan buah. Limonoid glukosida tidak mempunyai rasa dan larut

dalam air, sehingga buah jeruk dengan tingkat kematangan cukup memiliki rasa getir yang berkurang atau hilang sama sekali.

Dari hasil analisis limonoid diketahui bahwa limonoid hanya terdeteksi pada jeruk Purut sampel daun pendukung buah tua dan biji dari sembilan sampel organ tanaman. Pada jeruk Kalamondin, limonoid hanya terdeteksi pada biji, sedangkan pada daun serta buah muda maupun tua, limonoid tidak terdeteksi (di bawah limit deteksi, yaitu 0,0017 ppm). Kandungan limonoid pada daun pendukung buah tua hanya terdeteksi 1 ppm, sedangkan pada biji jeruk Kalamondin kandungan limonoid (74 ppm) lebih tinggi dibandingkan pada jeruk Purut (61 ppm) (Tabel 2). Hal ini bertentangan dengan beberapa hasil penelitian yang menyatakan bahwa limonoid

Tabel 2. Kandungan limonoid di dalam sampel organ tanaman jeruk Purut dan Kalamondin (Limonoid content in organ sample of Purut and Kalamondin)

Sampel organ (Organ sample)	Kandungan limonoid (Limonoid contents), ppm	
	Purut	Kalamondin
Daun muda (Young leaf)	< 0,0017	< 0,0017
Daun tua (Old leaf)	< 0,0017	< 0,0017
Daun pendukung bunga (Leaf supporting flower)	< 0,0017	< 0,0017
Daun pendukung pentil (Leaf supporting young fruit)	< 0,0017	< 0,0017
Daun pendukung buah muda (Leaf supporting young fruit)	< 0,0017	< 0,0017
Daun pendukung buah tua (Leaf supporting ripen fruit)	1	< 0,0017
Buah muda (Young fruit)	< 0,0017	< 0,0017
Buah tua (Ripen fruit)	< 0,0017	< 0,0017
Biji (Seeds)	61	74

dapat terdeteksi pada hampir seluruh bagian tanaman, walaupun umumnya kadar tertinggi ditemukan pada bagian biji.

Hasil analisis kandungan limonoid pada 7 kultivar pamelo di Thailand menunjukkan bahwa konsentrasi tertinggi limonin (salah satu senyawa limonoid pada jeruk) terdeteksi pada biji di semua kultivar, sedangkan kandungan limonin yang rendah ditemukan pada bagian albedo kemudian diikuti oleh flavedo, segmen membran, dan jus. Kadar limonoid yang terdeteksi berkisar antara 1.375,31-2.615,3 ppm dan terendah pada jus buah, yaitu 10-29,62 ppm. Kandungan limonoid bervariasi bergantung pada kultivar yang digunakan (Pichaiyongvongdee dan Haruenkit 2009). Hasil penelitian di Jepang diketahui bahwa pada tujuh varietas jeruk, total kadar limonoid berkisar antara 70-260 ppm bergantung pada varietasnya (Yoshihiko *et al.* 2003). Konsentrasi limonin mulai terdeteksi pada buah yang mulai masak dan perlahan-lahan mencapai maksimal pada saat buah siap dipanen (5 bulan setelah pembuahan). Konsentrasi limonoid juga dipengaruhi posisi buah. Buah yang berada pada bagian luar atau langsung terkena sinar matahari lebih tinggi dibandingkan dengan buah yang berada pada bagian dalam. Hal ini diduga bahwa limonin glukosida dihasilkan selama perkembangan buah yang dipicu oleh cahaya.

Kandungan Limonoid pada Embrio dan Planlet Kalamondin

Kandungan limonoid pada embrio dan planlet jeruk Kalamondin tidak terdeteksi (di bawah limit deteksi, yaitu 0,0017 ppm). Hal ini diduga karena belum optimalnya metode yang diaplikasikan untuk menganalisis kandungan limonoid pada fase embrio dan planlet hasil perbanyakan dengan metode somatik embriogenesis in vitro.

Pemanfaatan kultur sel untuk memproduksi metabolit sekunder telah banyak dilakukan, misalnya produksi asam rosmarinat dari *Salvia officinalis* dan *Coleus blumei*, anthroquinon dari *Morinda citrifolia*, shikonin dari *Lithospermum erythrorhizon*, berberin dari *Thalictrum minus* dan *Coptis japonica*, jatrorrhizin dari *Berberis wilsonae*, antosianin dari *Perilla frutescens*, diosgenin dari *Dioscorea deltoidea*, sanguinarin dari *Papever somniferum* dan serpentin dari *Catharanthus roseus* (Ravishankar

dan Ramachandra 2000). Selain itu, optimasi penggunaan sistem produksi biomassa secara massal juga banyak dilakukan, seperti produksi ginseng in vitro menggunakan bioreaktor berskala pabrikan di Korea, penggunaan *temporary immersion system bioreactor* untuk perbanyakan in vitro *Scutellaria baicalensis* Georgi (spesies obat herbal Cina) (Zobayed *et al.* 2004). Namun pemanfaatan kultur sel untuk memproduksi metabolit sekunder masih menemui beberapa kendala seperti instabilitas sel, rendemen yang masih rendah, pertumbuhan lambat, dan masalah dalam pengendalian skala. Strategi untuk meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam kultur sel antara lain (1) manipulasi nutrisi, (2) optimasi kondisi kultur, (3) elisitasi, (4) permeabilisasi, dan (5) pemanenan produk secara in situ (Ramachandra dan Ravishankar 2002).

KESIMPULAN

1. Perbedaan karakteristik pola pertumbuhan pada jeruk Purut dan Kalamondin menyebabkan perbedaan pola akumulasi flavonoid total.
2. Pada fase vegetatif, kandungan flavonoid jeruk Purut tertinggi ditemukan pada daun tua ($\pm 1,5$ ppm), sedangkan pada jeruk Kalamondin kandungan flavonoid tertinggi ditemukan pada daun-daun pendukung bunga (± 4 ppm) atau setara $\pm 2,7$ kali dibandingkan jeruk Purut.
3. Pada fase generatif, konsentrasi flavonoid total pada buah muda dan tua jeruk Purut sama dengan konsentrasi flavonoid pada buah tua Kalamondin (18,8 ppm) atau minimal setara dengan 4-13 kali konsentrasi pada fase vegetatif.
4. Kandungan limonoid pada jeruk Purut hanya terdeteksi pada daun pendukung buah tua dan biji buah tua, masing-masing sebesar 1 dan 61 ppm, sedangkan pada Kalamondin hanya terdeteksi pada biji buah tua (74 ppm).

PUSTAKA

1. Cano, A., A. Medina, and A. Bermejo. 2008. Bioactive Compounds in Different Citrus Varieties. Discrimination Among Cultivars. *J. Food Composition and Anal.* 21:377-381.

2. Fergusson, J. J. 2002. *Medicinal Use of Citrus*. Series of the Horticultural Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 3 pp.
3. Jacob, R., S. Hasegawa, and G. Manners. 2000. The Potential of Citrus Limonoids as Anticancer Agents. *Perishables Handling Quarterly Issue* No. 102.
4. Kato, M., Y. Ikoma, H. Matsumoto, M. Sugiura, H. Hyodo, and M. Cano. 2004. Accumulation of Carotenoids and Expression of Carotenoid Biosynthetic Genes During Maturation in Citrus Fruit. *Plant Physiol.* 134:824-837.
5. Khalil, A.T., G.T. Maatooq, and K.A. El-Sayed. 2003. Limonoid from *Citrus reticulata* Z. *Naturforsch* 58 c:165-170.
6. Lewinsohn, E., L. Britsch, Y. Mazur, and J. Gressel. 1989. Flavone Glycoside Biosynthesis in Citrus. *Plant Physiol.* 91:1323-1328
7. Nogata, Y., K. Sakamoto, H. Shiratsuchi, T. Ishii, M. Yano, and H. Ohta. 2006. Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci. Biotech. Biochem.* 70(1):178-192.
8. Paulose, S.M. 2005. Isolation and Effects of Citrus Limonoids on Cytochrome P450 Inhibition, Apoptotic Induction and Cytotoxicity on Human Cancer Cells. *Dissertation*. Texas A and M University. 112 pp.
9. Pichaiyongvongdee S. and R. Haruenkit. 2009. Comparative Studies of Limonin and Naringin Distribution in Different Parts of Pummel [*Citrus grandis*(L.) Osbeck] Cultivars Grown in Thailand. *Kasetsert J [Nat. Sci]* 43:28-36.
10. Ramachandra Rao, S. and G.A. Ravishankar. 2002. Plant Cell Culture: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnol. Advance.* 20:101-153.
11. Ravishankar, G.A. and S. Ramachandra Rao. 2000. Biotechnological Production of Phyto-pharmaceuticals. *J. Biochem, Mol Biol Biophys* (4)73-102.
12. Spiegel-Roy, P. and E.E. Goldschmidt. 1996. *Biology of Citrus*. Cambridge University Press, UK. 230 pp.
13. Tripoli, E., M. Guardia, S. Giammanco, D. Majo, and M. Giamanco. 2007. Citrus Flavonoids: Molecular Structure, Biological Activity and Nutritional Properties: A Review. *Food Chem.* 104:466-479.
14. Xu, J., N. tao, Q. Liu, and X. Deng. 2006. Presence of Diverse of Lycopene/ β -carotene in Five Pink or Red-Fleshed Citrus Cultivars. *Scientia Horticulturae* 108:181-184.
15. Yoshihiko, O., M. Kumi, and I. Hidemi. 2003. Limonoid Glucosides Contents of Several Citrus Fruits in Japan and the Influence of Canopy Depth During Fruit Development on them. *Food Preservation Sci.* 29(3):135-140.
16. Zobayed, S. M. A., S. J. Murch, H. P. V. Rupasinghe, J. G. de Boer, B. W. Glickman, and P. K. Saxena. 2004. Optimized System for Biomass Production, Chemical Characterization and Evaluation of Chemo-preventive Properties of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Plant Sci.* 167 (3):439-446.